

**LECITHIN: CHOLESTERIN –
ACYLTRANSFERASE – REAKTION
BESTIMMUNGSMETHODE UND NORMALWERTE**

Eberhard Deutsch

1974

AUS DER MEDIZINISCHEN POLIKLINIK
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof.Dr. W.Seitz

LECITHIN : CHOLESTERIN - ACYLTRANSFFERASE - REAKTION
BESTIMMUNGSMETHODE UND NORMALWERTE

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Eberhard Teutsch
aus Mediasch

München 1973



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Prof.Dr.W.Seitz

Mitberichterstatter: Prof.Dr.F.Eberhagen

Dekan: Prof.Dr.W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 22.1.1974

In Dankbarkeit meinen Eltern gewidmet.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551924_0088

I N H A L T

I.	EINLEITUNG	2
	1. Mechanismus der Reaktion	2
	2. Biologische Bedeutung der LCAT	7
	3. Pathologische Veränderungen der LCAT	12
II.	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	16
III.	METHODIK	17
IV.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	20
	1. Kinetik der Reaktion	20
	2. Einfluß des Puffers	22
	3. Effekt des pH-Wertes auf den Reaktionsablauf	23
	4. Inkubationstemperatur und -zeit	24
	5. Effekt von verschiedenen Substanzen auf den Reaktionsablauf	25
	a) polyvalente Anionen und Kationen	
	b) Substanzen mit SH-Gruppen	
	6. Stabilität der LCAT	30
	7. Normalwerte	32
V.	ZUSAMMENFASSUNG	46
VI.	LITERATURNACHWEIS	47

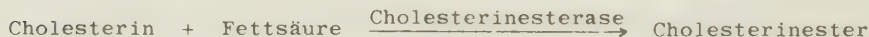
I. EINLEITUNG

1. Mechanismus der Reaktion

Die intravasale Veresterung von Plasmacholesterin wurde zum ersten Mal von S p e r r y (1) beschrieben. Er stellte fest, daß die Inkubation von Humanserum über eine Zeitspanne von 3 Tagen bei 37-40°C zu einem großen Anstieg der Cholesterinester führte. Das Gesamtcholesterin blieb dabei unverändert.

Um den Mechanismus dieser Reaktion zu klären, mußte zuerst der Ursprung und die Art der Fettsäuren, welche auf das Cholesterin übertragen werden, bestimmt werden. Freie Fettsäuren kommen dabei nicht in Frage. Wenn sie mit Blutserum inkubiert werden, findet man sie nicht an den Cholesterinestern wieder, sondern in den Mono - Di - und Triglyceriden (2). S p e r r y vertrat die Ansicht, daß Plasmaphospholipide die Fettsäuredonatoren seien. Die Fettsäuren könnten durch eine Lipase abgespalten und mit Hilfe einer Cholesterinesterase auf das Cholesterin übertragen werden. L e B r e t a n und P a n t a l e o n (3) zeigten dann, daß die Phospholipide tatsächlich die Quelle der Fettsäuren sind. Ihre Vorstellung, daß Lecithin zur Veresterung verwendet wird, fanden durch F t i e n n e und P o l o n o v s k i (4) Bestätigung, welche feststellten, daß von den Phospholipiden nur das Lecithin in erheblichem Maße abgebaut wird. Sie nahmen an, daß der Abfall des Lecithins

von einer Lecithinase "B" verursacht wird. Dann würde S p e r r y ' s Vorstellung durch die letzte Annahme erweitert, folgendermaßen zu formulieren sein:

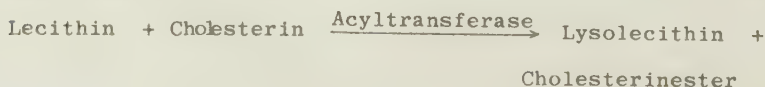


Hinzugabe von Ovolecithin steigert wesentlich die Veresterung, eine Tatsache, die für diese Hypothese spricht.

Eine endgültige Klärung des Reaktionsmechanismus erfolgte mit der Verwendung von ^{14}C -Cholesterin als Inkubationssubstanz. G l o m s e t (5) versuchte den Beweis zu erbringen, daß es sich bei der Lecithinase "B" nicht um eine Hydrolase, sondern um eine Transferase handelt. Er stellte fest, daß das "Veresterungsenzym" eine Fettsäure des Lecithins für die Veresterung verwenden kann, daß aber die gleiche Fettsäure, wenn sie an Albumin gebunden ist, nicht in die Cholesterinester eingebaut wird. Lecithin und Cholesterin verringern sich im Inkubationsansatz in equimolekularer Weise (5). G l o m s e t (2) zog daraus folgende Schlußfolgerungen:

1. Das Lecithin ist der Donator der Fettsäuren
2. Der Abfall des Lecithins ist das Ergebnis einer Transesterifikation und nicht einer Hydrolase.

Aufgrund seiner Ergebnisse stellte er sich den Veresterungsmechanismus so vor:



Seiner Meinung nach ist also das Enzym eine Lecithin: Cholesterin-Acytransferase (EC 2.3.1.) (LCAT).

Die Fettsäuren, welche zur Veresterung verwendet werden, sind zu 86-97% ungesättigt und β -ständig am Lecithin gebunden (5). Die Tatsache, daß in den Cholesterinestern wesentlich mehr Linolat als Arachidonat vorgefunden wird, läßt G o o d m a n (15) zu der gleichen Schlußfolgerung kommen, daß nämlich die Acyltransferase den β -ständig am Lecithin veresterten Fettsäuren gegenüber eine Spezifität aufweist. Die Versuche von P o r t m a n und S u g a n o (14) mit Human-und Rattenserum zeigen schließlich, daß die Zusammensetzung der gebildeten Cholesterinester nicht von der Zusammensetzung des Substrats, sondern von der Spezifität des Enzyms abhängt.

Die Acyltransferase des Humanserums ist der Linolsäure gegenüber spezifisch, die Cholesterinester der Ratten enthalten dagegen viel Arachidonat (6). Es ist nicht sicher, ob die Linolsäure und die Arachidonsäure die gleiche Position in der Lipoproteidstruktur einnehmen. Falls dieses nicht der Fall sein sollte, unterscheiden sich die beiden Säuren nur durch die unterschiedliche Zugänglichkeit für das Enzym und dann könnte die Fettsäurespezifität nur eine scheinbare sein. Auf der anderen Seite besteht die Möglichkeit, daß die Spezifität der Acyltransferase primär von der Lipoproteidstruktur abhängig ist. Um in dieser Richtung eine Klärung herbeizuführen, trennte G l o m s e t (36) nach der Inkubation

die Lipoproteide durch Ultrazentrifugation.

Dabei ergaben sich folgende Ergebnisse:

1. Der größte Abfall des unveresterten Cholesterins ist in der Fraktion der Lipoproteide geringer Dichte vorhanden.
2. Der größte Verlust an Lecithin ist bei den Lipoproteiden hoher Dichte aufgetreten.
3. Lysolecithin ist dagegen in der Fraktion der Lipoproteide sehr hoher Dichte angestiegen.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, daß die Lipoproteide hoher Dichte eine wesentliche Rolle als Lecithindona-toren spielen. Es erhebt sich nun die Frage, worin die Spezifität der Acyltransferase besteht, in der Fettsäure oder in dem Lipoproteid, an welches erstere gebunden ist? Die Ergebnisse von P o r t m a n und S u g a n o (14) sind nicht unvereinbar mit der Möglichkeit, daß die Acyltransferase des Human- und Rattenserums nicht spezifisch mit Fettsäuren, sondern selektiv mit homologen Lipoproteiden reagieren kann. Nach Inkubation von ^{14}C -Cholesterin mit Humanserum konnte G l o m s e t (6) in den Lipoproteiden hoher Dichte die größte Radioaktivität finden. Dieses Ergebnis würde auch für eine Lipoproteid-spezifität der Acyltransferase sprechen.

Die Struktur der Lipoproteide kann nicht nur die Spezifität und den Grad der Veresterung beeinflussen, sondern ist auch für die Ablaufrichtung der Reaktion maßgebend. Ein Großteil des gebildeten Lysolecithins

wird an Albumin gebunden. Dieses bedeutet nicht nur einen großen Verlust an Phospholipiden der Lipoproteide, sondern kann auch eine Erklärung dafür sein, weswegen die Reaktion in Richtung Veresterung und nicht umgekehrt verläuft. Dadurch, daß das Lysolecithin nicht an die Lipoproteide, welche mit dem Enzym reagieren, gebunden wird, ist die Transacylation in umgekehrtem Sinn nicht möglich. Wenn dieses den Tatsachen entspricht, dann könnte die Veresterung in Abwesenheit von Albumin nicht stattfinden. Die anschließende Dissoziation des gebildeten Lysolecithins durch die Lysolecithinase verhindert eine hemmend wirkende Erhöhung des Lysolecithins. Dadurch wird der Ablauf der Reaktion in Richtung Veresterung beibehalten.

2. Biologische Bedeutung der LCAT-Reaktion

Eine Anzahl von Versuchen sind nach G l o m s e t (6) beweisend dafür, daß die LCAT-Reaktion eine physiologisch wichtige Quelle der Plasmacholesterinester ist:

1. Aufgrund der Veresterungsversuche in vitro konnte errechnet werden, wieviel Ester quantitativ in vivo gebildet werden müßten. Dieses theoretische Ergebnis stimmte mit der tatsächlichen Estermenge des frischen Humanserums überein.
2. Die Zusammensetzung der Cholesterinester nach einer Inkubation in vitro ist mit der im frischem Serum vorgefundenen Ester identisch (14).
3. Der Einbau von radioaktivem Cholesterin in die Cholesterinester ist sowohl in vitro als auch in vivo gleich (15).
4. Bei Personen mit hereditärem Mangel an Plasmacholesterinester ist keine oder eine sehr geringe Aktivität der LCAT festzustellen (7).
5. Im Serum ist die Konzentration der LCAT wesentlich höher als in den Gewebsorganen (25).

Aus diesen Untersuchungsergebnissen kann die Folgerung gezogen werden, daß die LCAT eine spezifische Plasmafunktion hat (6). Im Gegensatz zu dieser neueren Auffassung steht die alte Ansicht, daß die Cholesterinester fast ausschließlich in der Leber gebildet werden. Dafür sprechen folgende Untersuchungsergebnisse:

1. Die Plasmacholesterinveresterung ist bei Tieren nach einer Hepatektomie stark verringert (26). Bei schein-

operierten Ratten wurde 44,5% des hinzugegebenen Cholesterins verestert, während bei den hepatektomierten Ratten die Veresterung nur noch 5,4% betrug.

2. Die Leber enthält ein aktives Cholesterinveresterungssystem (27).
3. Nach Verabreichung von markiertem Cholesterin sind die radioaktiven Lebercholesterinester höher als die des Plasmas (28).
4. Die Lebermikrosomen sind die Hauptquelle der gesättigten und monounsättigten Cholesterinester (29).

In der Leber werden hauptsächlich das Cholesterinoleat und Palmitat gebildet (27), während im Plasma das Arachidonat und Linolat den Hauptanteil der Cholesterinester darstellen. Demnach wäre eine intravasale Cholesterinveresterung mit einer hepatischen Esterbildung nicht unvereinbar. Die Rolle des Cholesterinveresterungssystem der Leber als Quelle der Plasmacholesterinester bleibt noch zu klären.

Für den Fall, daß die LCAT für die Entstehung der Mehrzahl der im Blutplasma enthaltenen Cholesterinester verantwortlich gemacht werden kann, bleibt die wichtige Frage zu beantworten, warum dieses Enzym im Plasma vorkommt und welche biologische Bedeutung es hat. Es besteht die Möglichkeit, daß die LCAT im Cholesterintransport vom peripheren Gewebe zur Leber eine Schlüsselstellung einnimmt. Ein Transportmechanismus dieser Art ist wahrscheinlich vorhanden, denn die meisten Zellen können Cholesterin synthetisieren, es aber nicht selber metabolisieren (30).

Die Versuche von M u r p h y (31) weisen darauf hin, daß eine Beteiligung der LCAT an diesem Transportsystem möglich wäre. Er führte seine Untersuchungen hauptsächlich an Erythrozyten durch. Er inkubierte sie mit einem Serum, in welchem der Gehalt an unverestertem Cholesterin durch eine vorausgegangene Inkubation stark verringert wurde. M u r p h y konnte einen eindeutigen Übertritt des unveresterten Cholesterins aus den Erythrozyten in das Serum feststellen. Wahrscheinlich findet ein ähnlicher Transport auch an anderen Gewebszellen, wie Muskel- und Nierenzellen statt. Der Mechanismus des Cholesterintransports von der Gewebszelle in die extrazelluläre Flüssigkeit hätte nach G l o m s e t (6) folgenden Verlauf:

Die LCAT wird von der Leber, in der sie in einer inaktiven Form enthalten ist, an das Blut abgegeben. Sie gelangt zusammen mit den Vehikellipoproteiden hoher Dichte durch die Kapillarendothelschicht hindurch in den extrazellulären Gewebsraum. Hier sättigen sich beim Kontakt mit der Zellmembran die Lipoproteide mit den aus dem Zellinneren an die Außenfläche der Zellmembran transportierten Cholesterinmolekülen ab. Nun tritt die LCAT in Aktion. Es entstehen als Folgeprodukte Lysolecithin und Cholesterinester:

Erstere werden vom Albumin gebunden, letztere auf Lipoproteide geringer Dichte übertragen. Dadurch werden die Lipoproteide hoher Dichte wieder frei vom Cholesterin, können sich erneut mit dieser Substanz aufsättigen und der ganze Vorgang wiederholt sich.

Beim Passieren der Leber wird das veresterte Cholesterin entfernt und das verlorengegangene Lecithin ersetzt. Die Lipoproteide gelangen via Lymphe wieder in die Blutbahn, denn in der Lymphe konnte sowohl eine LCAT-Aktivität als auch alpha- und beta-Lipoproteide (6,32) festgestellt werden.

In Abbildung 1 wird der Transportmechanismus des Cholesterins von der Membrane peripherer Zellen zur Leber schematisch dargestellt.

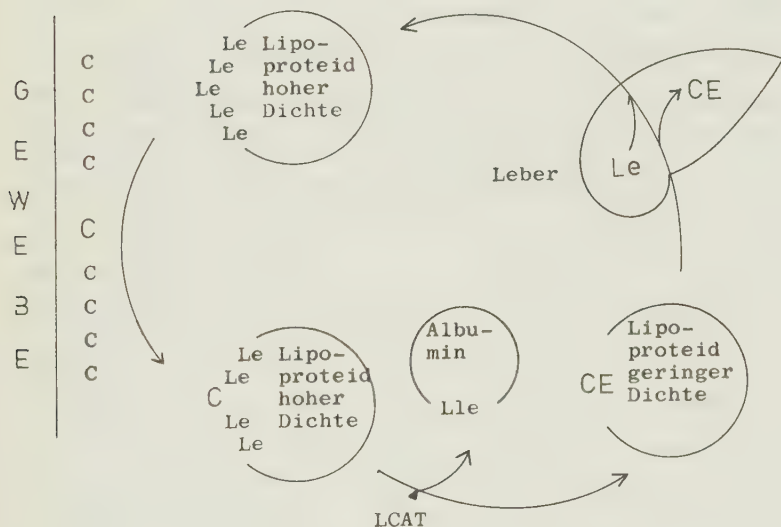


Abbildung 1

Schematische Darstellung des Cholesterintransports.

Abkürzungen: C - Cholesterin, CE - Cholesterinester

Le - Lecithin, Lle - Lysolecithin.

Es besteht die Möglichkeit, daß der LCAT-Reaktion außer im Zusammenhang mit Cholesterintransport aus der Gewebs - in die Leberzelle noch eine Reihe anderer Aufgaben zukommt. Einen gewissen Einfluß könnte z.B. der Abbau des Lecithins zu Lysolecithin und seine weitere Metabolisierung in der Leber auf den allgemeinen Lipoproteidstoffwechsel haben. Die Erforschung der physiologischen Rolle des Lysolecithins befindet sich noch im Anfangsstadium. Die Cholesterinester könnten unter Umständen nur ein Nebenprodukt während der Veränderung der Phospholipide sein (6).

Die Anämie und Proteinurie der Patienten mit einem LCAT-Mangel weisen auf einen möglichen Einfluß der LCAT auf die Erythrozytenlebensdauer und auf die Filterfunktion der Nierenglomerula hin (6).

3. Pathologische Veränderungen der LCAT

Veränderungen der Cholesterinesterkonzentration bei Leberzellschädigungen sind schon seit langer Zeit bekannt. Durch die Erweiterung der Erkenntnisse über die LCAT-Funktion stellte sich die Frage, ob diese Veränderungen mit der LCAT-Aktivität im Zusammenhang stehen. Für die Möglichkeit dieser Abhängigkeit sprechen die Befunde von G j o n e und N o r u m (7), die bei Personen mit einem hereditärem Mangel an Cholesterinester keine LCAT-Aktivität feststellen konnten. Sie beschrieben das bis dahin unbekannte Syndrom bei drei norwegischen Geschwistern, von denen aber nur die älteste Person klinisch krank war. Alle drei wiesen eine Proteinurie und Anämie auf. Keine zeigte Symptome einer Leber-, Nieren- oder Milzerkrankung. Die Untersuchung der Serumlipide ergab erhöhte Werte an Gesamtcholesterin, welches fast ausschließlich in freier Form vorlag. Die Cholesterinester fehlten also nahezu vollständig. Phospholipide und Triglyceride waren ebenfalls stark erhöht. Bei der Bestimmung der einzelnen Fraktionen der Phospholipide stellte es sich heraus, daß die Werte des Lysolecithins besonders tief lagen (1,3% des Gesamtphosphors, normal: 5,5%). Die Serumlipoproteidelektrophorese zeigte ein Fehlen der alfa- und prä-beta-Lipoproteide. Die ausgeprägte Anämie (7,6 g Hb/100 ml) konnte auf eine Verkürzung der Erythrozytenlebensdauer zurückgeführt werden. Es waren keine Zeichen einer beschleunigten Hämolyse in der Milz zu beobachten. Die Halbwertszeit des Plasmaeisens

betrug 60 Minuten (normal 80-100), was einen Austausch von 69% des Gesamteisens pro Stunde bedeutet (normal : 35-50%). Differentialdiagnostisch konnten durch Nieren- und Leberpunktion ein nephrotisches Syndrom, eine primäre Hyperlipoproteinämie und das Angiokeratoma corporis diffusum ausgeschlossen werden. Da die Leberfunktionsteste normal waren und keine Zeichen einer Leberzellschädigung feststellbar waren, kann man mit großer Wahrscheinlichkeit annehmen, daß die Veränderungen der Serumlipide auf einen primären LCAT-Mangel zurückzuführen sind.

Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden noch vier Fälle eines LCAT-Mangels beschrieben. H a m n s t r ö m, G j o n e und N o r u m (42) stellten bei einer schwedischen Frau einen LCAT-Mangel fest. Sowohl die klinischen Symptome als auch die laborchemischen Untersuchungen zeigten eine auffallende Parallelität zu dem 1. Fall. Schon seit dem 3.-4. Lebensjahr war bei ihr eine Proteinurie und eine Hornhauttrübung bekannt. Das Gesamtcholesterin, die Phospholipide und die Triglyceride waren erhöht, die Cholesterinester betrugen nur 26,6% (normal: 60-80%). Die Lecithinwerte waren sehr hoch, während die Konzentration des Lysolecithins stark erniedrigt war. Die Untersuchung der LCAT-Aktivität zeigte, daß sie 10 mal geringer als bei Normalpersonen war. Es fehlten, wie auch im ersten Fall, die alfa- und prä-beta-Lipoproteide. Die normochrome Anämie mit erhöhter Retikulozytenzahl und reduzierter Erythrozytenhalbwertszeit auf 17 Tage vervollständigten das klinische Bild.

Der 5. Patient, welcher wahrscheinlich auch an einem LCAT-Mangel erkrankte, war der Bruder dieser Patientin. Er zeigte ebenfalls eine Hornhauttrübung und eine Proteinurie. Auffallend war sein lipämisches Serum. Er verstarb an einer Urämie. Anamnestisch konnte erfragt werden, daß der Großvater eine Hornhauttrübung hatte und der Onkel an einer Urämie gestorben ist.

Der 6. und 7. Fall eines LCAT-Mangels wurden von Norum, Borstig und Grundt (42) beschrieben. Diesmal handelte es sich um eine norwegische Familie, in welcher die Tochter und der Sohn die typischen Zeichen eines LCAT-Mangels hatten: Hornhauttrübung, normochrome Anämie, Proteinurie, keine LCAT-Aktivität, hoher Gehalt an unverestertem Cholesterin, Lecithin und Triglyceride, niedrige Werte von Cholesterinestern und Lipoproteiden.

Wegen der geringen Zahl der bis jetzt beschriebenen Fälle von LCAT-Mangel, konnte der Vererbungsmodus noch nicht genau geklärt werden. Da beide Geschlechter betroffen sein können und weder die Eltern noch die Kinder der Patienten erkrankt waren, ist eine autosomale recessive Vererbung möglich (40).

Veränderungen der LCAT-Aktivität konnten auch bei Lebererkrankungen beobachtet werden. Gallengangverschlüsse führen zu einem Anstieg des unveresterten Cholesterins und des Lecithins und zu einem relativen Abfall der Cholesterinester (35), während bei Leberschädigungen (Hepatitis, Cirrhose) der Spiegel der Cholesterinester

auch niedriger ist. Eine umfangreiche Untersuchung über die Veränderungen der LCAT-Aktivität bei Hepatitis-kranken wurde von S p a l m und E l t z (37) an 31 Kindern mit leichter bis mittelschwerer Form durchgeführt. Im akuten Stadium der Hepatitis beträgt der Abfall der Cholesterinester 62,5% und der absolute Anstieg des unveresterten Cholesterins 61,3%. Von dem Abfall der Cholesterinester sind sämtliche Fraktionen betroffen (Linolsäure 33,2%, die anderen Fraktionen 40% der Normalwerte). Die Ursache dieser erheblichen Abnahme der Cholesterinester wird in einer verringerten Veresterungskapazität der geschädigten Leber gesehen. Für die Senkung des Cholesterinlinolats wird eine unzureichende Fettzufuhr verantwortlich gemacht.

II. ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Aus der Beobachtung heraus, daß Leberzellschädigungen Veränderungen der LCAT-Aktivität verursachen, entstand die Frage, ob diese Reaktion nicht als ein klinisch-chemischer Parameter der Leberfunktion verwendet werden kann. Um diese Untersuchungsmethode für das Routinelabor verwendbar zu machen, mußte die Inkubationszeit herabgesetzt werden. Durch Hinzugabe von stimulierenden Substanzen sollte versucht werden, die Kinetik der Reaktion so zu beeinflussen, daß trotz verkürzter Inkubationszeit eine meßbare Veresterung stattfindet.

Weiterhin sollten die Normalwerte der einheimischen Bevölkerung und deren Abhängigkeit von Geschlecht und Alter bestimmt werden.

III. METHODIK

Prinzip: Die Umwandlungsrate von exogenem, ^{14}C -markiertem Cholesterin in Cholesterinester unter definierten Inkubationsbedingungen mit dem zu untersuchenden Serum wurde bestimmt.

Untersuchungsmaterial: Blutserum, das nach der Entnahme sofort abzentrifugiert worden war. Die Untersuchung wurde am Tage der Probennahme oder am darauffolgenden vorgenommen.

Substrat: ^{14}C -Cholesterin (Charge 669 der CEA) mit einer spezifischen Aktivität von 25,1 mC/mMol in 1 ml Benzol. Das Benzol wurde im Rotationsverdampfer abdestilliert und der Rückstand in 10 ml Äthanol gelöst aufbewahrt. Aus dieser Stammlösung wurde das gebrauchsfertige Substrat wie folgt hergestellt (P o r t e und H a v e l 9):
0,5 ml der Lösung wurde mit 20 ml einer 5%-igen Albuminlösung mit einem Magnetrührer ca. 1-2 Stunden lang durchgemischt, danach das Äthanol vorsichtig abdestilliert und das gebrauchsfertige Substrat in kleinen Portionen bei -25°C eingefroren.

Puffer: Tris/HCl-Puffer 0,2 molar, pH 7,5.

Aktivator: 0,5 molare Gluthationlösung

Ansatz: 0,5 ml Serum

0,1 ml ^{14}C -Cholesterin-Albuminlösung

1,0 ml Tris/HCl-Puffer pH 7,5

1,0 ml Gluthationlösung

Inkubation: 3 Stunden bei 37°C im Wasserbad.

Um zu diesem optimalen Ansatz zu kommen, wurden die verschiedenen Parameter in später beschriebenen Versuchen variiert.

Nach der Inkubation wurden zur Fällung der Eiweißstoffe und zur Extraktion des Cholesterins 2 ml des Ansatzes zu 20 ml Isopropanol hinzugegeben. Nach dem Abzentrifugieren des Niederschlages wurde der Überstand weiteren Verarbeitungen unterzogen:

1) Bestimmung des Gesamt-¹⁴C-Cholesterins.

Zu diesem Zweck wurden 2 ml des Überstandes in ein Szintillatorzählglas pipetiert. Nach Eindampfen im Trockenschrank bei 95°C und Lösen des Rückstandes in 10 ml PPO-POPOP-Toluolszintillatorflüssigkeit wurde die Aktivität bestimmt (Tricarb-Strahlungsmeßgerät der Fa. Packard, Einstellung: 10 Minuten, Gain: 7,5%, Fensterbreite 50-1000). Die Aktivität der Proben lag bei 2000 Impulsen pro Minute.

2) Bestimmung des ¹⁴C-Gehaltes in den Cholesterinestern.

a) Dünnschichtchromatografische Abtrennung der Cholesterinester: 2 ml des Überstandes wurden auf ein geringes Volumen eingedampft und das Konzentrat auf eine Kieselgelplatte aufgetragen. Zu deren Herstellung wurde Kieselgel G nach Stahl verwendet (30 gr + 70 ml Wasser). Die Auftrennung erfolgte in einem Petroläther-Diäthyläther-Eisessiggemisch (90:10:1). Die Cholesterinesterfraktion wurde durch Behandlung der Platte mit Joddämpfen sichtbar gemacht. Nach anschließender Entfärbung wurden die entsprechenden Stellen der Kieselgelplatte in ein Zentrifugen-

glas abgekratzt und durch zweimaliges Auswaschen mit je 5 ml Chloroform-Methanol (2:1) und 5 ml Methanol eluiert. Nach Eindampfen der Eluate und Lösen des Rückstandes in Toluolszintillatorflüssigkeit wurde die Radioaktivität gemessen.

b) Abtrennung der Cholesterinester durch Digitoninfällung

Bei den letzten Versuchen wurden die Cholesterinester mit Hilfe der Digitoninfällung isoliert. Um bei diesem Verfahren die Genauigkeit zu vergrößern, wurden 20 mg freies, nicht markiertes Cholesterin dem Extraktionsmittel zugegeben. Dadurch ließ sich die Trennschärfe des Reinigungsschrittes wesentlich verbessern. Zu 2 ml Extraktlösung wurde 1 ml Digitoninlösung (1% in 50% Alkohol) zugesetzt, 10 Minuten bei 4000 U/Min. zentrifugiert und 2 ml des erhaltenen Überstandes in ein Zählglas pipetiert. Nach Eindampfen bei 95°C im Trockenschrank wurden 10 ml Toluolszintillatorflüssigkeit hinzugegeben und die Messung durchgeführt. Die Werte wurden in Impulsen pro Minute angegeben. Die Umrechnung der Ergebnisse in Internationale Einheiten (IE) erfolgte durch Multiplikation der erhaltenen Impulszahl in der Probe nach Abzug des Leerwertes mit dem Faktor $1,03 \times 10^{-9}$, der aus der spezifischen Aktivität unter Berücksichtigung der Verdünnung und des Quenchfaktors errechnet wurde.

IV. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

1. Kinetik der Reaktion

Um den Einfluß der Enzymmenge auf den Reaktionsablauf zu untersuchen, wurden steigende Mengen von Humanserum verwendet. Wie Abbildung 2 zeigt, wird dadurch ein linearer Anstieg der Veresterungsgeschwindigkeit hervorgerufen. Das Verhältnis zwischen Enzymaktivität und Cholesterinveresterungsrate ist direkt proportional.

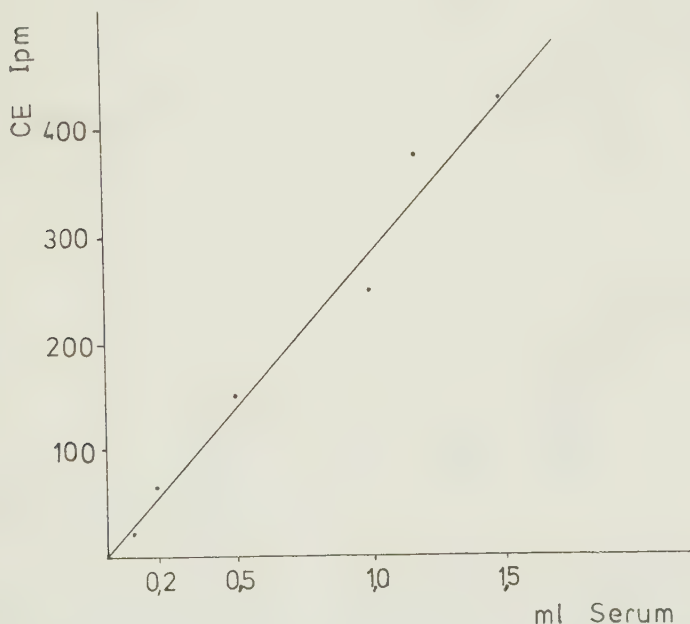


Abbildung 2

Abhängigkeit der Umwandlung von freiem Cholesterin in Cholesterinester von der Enzymmenge. Inkubationsbedingungen: 3 Stunden bei 37°C.

Trennungsverfahren: Dünnschichtchromatografie.

In gleicher Weise wurde die Substratmenge, ^{14}C -Cholesterin-Albuminlösung verändert. Aus Abbildung 3 ist ersichtlich, daß auch in diesem Falle der Cholesterinesteranstieg linear verläuft.

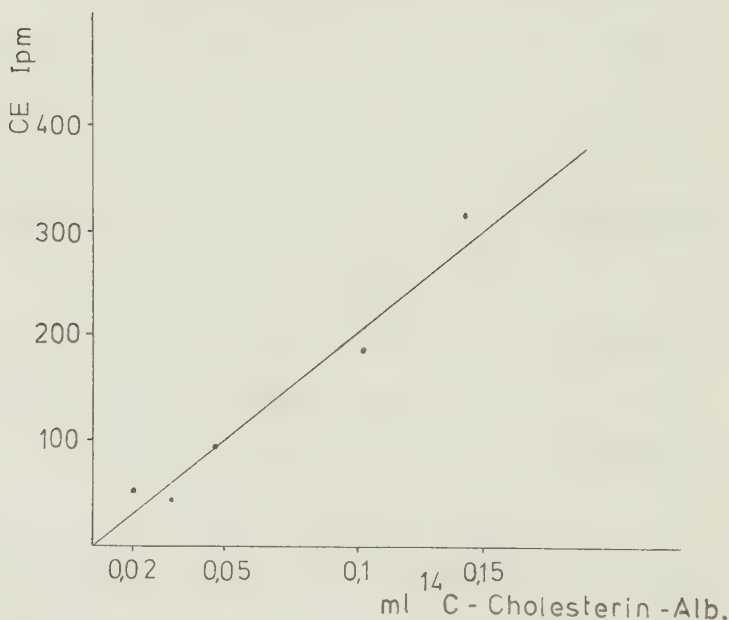


Abbildung 3

Abhängigkeit der Umwandlung von freiem Cholesterin in Cholesterinester von der Substratkonzentration.

Inkubationsbedingungen wie bei Abbildung 2.

Eine Stimulation der Reaktion durch Hinzugabe von Fettsäuredonatoren (essentielle Phospholipide oder hitzeaktiviertes Plasma) konnte nicht erzielt werden. Es wurde

vielmehr durch derartige Zusätze eine fast vollständige Hemmung der Veresterung festgestellt. G l o m s e t (6) hatte demgegenüber durch Zugabe von Lecithin eine maximale Stimulation beobachtet.

2. Der Einfluß des Puffers

In der nächsten Versuchsreihe wurden verschiedene Pufferlösungen mit dem gleichen pH-Wert von 7,5 und Molarität von 0,2 verwendet. Die Ergebnisse sind in der untenstehenden Tabelle zusammengefaßt. Mit dem Tris/HCl-Puffer fand die höchste Cholesterinveresterung statt. Die Ergebnisse sind in Internationalen Enzymeinheiten angegeben.

Puffer	Cholesterinester IE
Tris/HCl	35,5
Citrat-Phosphat	28,4
Phosphat	27,0
Glycin	33,5

Tabelle 1

Cholesterinveresterung mit verschiedenen Pufferlösungen bei einem pH-Wert von 7,5. Inkubationszeit: 6 Stunden, Inkubationstemperatur: 37°C.
Trennungsverfahren: Dünnschichtchromatografie.

3. Der Effekt des pH-Wertes.

Der Effekt des pH-Wertes auf die LCAT-Aktivität ist in Abbildung 4 wiedergegeben. Es wurde Tris/HCl-Puffer verwendet, dessen pH-Wert mit Hilfe von 1N HCl- bzw. NaOH-Lösung verändert wurde. Das pH-Optimum liegt zwischen 7,2 und 7,8.

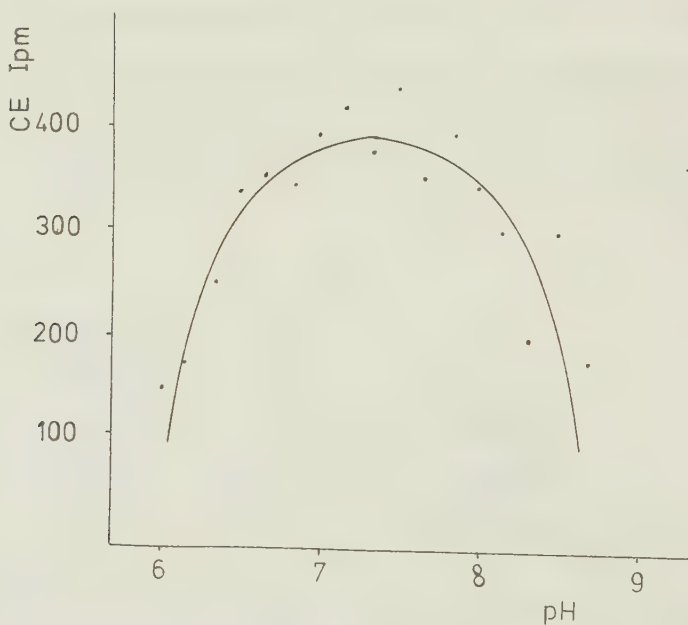


Abbildung 4

Der Effekt des pH-Wertes auf die LCAT-Aktivität.
Inkubationsbedingungen wie bei Tab. 1.

4. Der Einfluß der Inkubationstemperatur und -zeit

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die LCAT-Aktivität bei verschiedenen Temperaturen und Inkubationszeiten untersucht. Dabei wurde festgestellt, daß der Ablauf der Reaktion bei 37°C wesentlich intensiver ist als bei 25°C . Während den ersten 6 Stunden hat die Reaktion einen fast linearen Verlauf, flacht dann aber im Laufe der weiteren 12 Stunden ab.

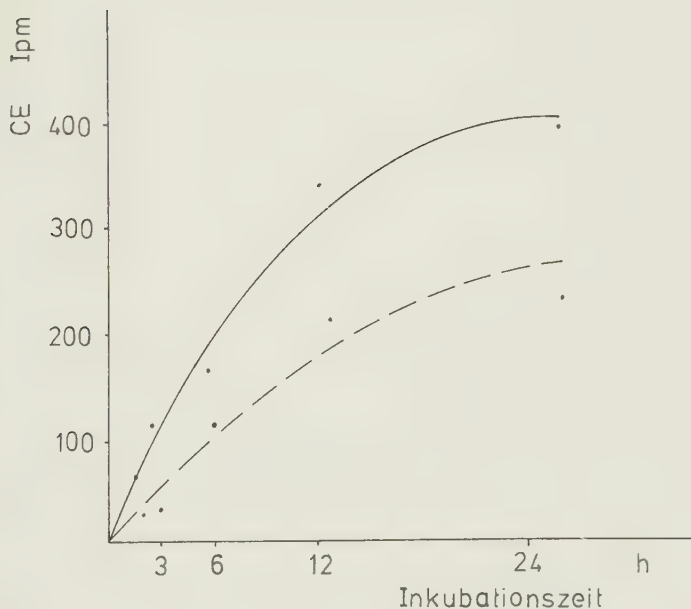


Abbildung 5

Die Zeitkurve bei 37°C (—) und bei 25°C (----). Trennungsv erfahren: Dünnschichtchromatografie. Die Ergebnisse sind in Impulsen pro Minute angegeben.

5. Der Effekt von verschiedenen Zusätzen auf den Ablauf der Reaktion

In einer weiteren Versuchsserie wurde der Einfluß verschiedener Substanzen auf die LCAT-Aktivität mit der Absicht untersucht, eine Stimulation der Reaktion zu erzielen.

- a) Anfangs wurden verschiedene Anionen und Kationen in steigender Konzentration verwendet. Aus Abbildung 6 ist zu entnehmen, daß MnCl_2 -, MgCl_2 - und CaCl_2 -Zusätze eine hemmende Wirkung auf die LCAT-Aktivität haben.

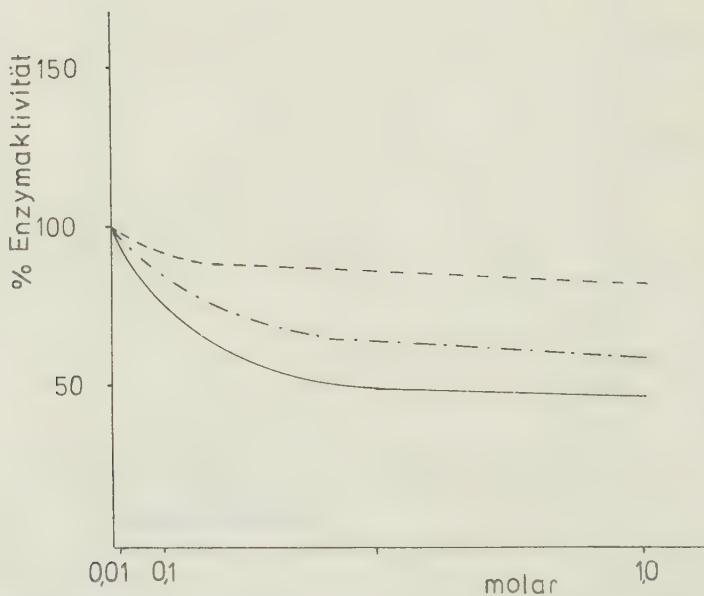


Abbildung 6

Der Effekt von MnCl_2 (-----), MgCl_2 (-.-.-) und CaCl_2 (——) auf die LCAT-Aktivität. Inkubationsbedingungen wie bei Tab. 1. Die Ergebnisse sind in % der Ausgangsaktivität angegeben.

Über den Einfluß der Phosphationen herrscht keine einheitliche Meinung. G l o m s e t (11) erzielte eine Stimulation von 190%, während R a t t i und B i a n c h i (12) den Phosphationen eine hemmende Wirkung zuschreiben. G l o m s e t beobachtet weiter eine erhöhte LCAT-Aktivität in Gegenwart von Na_2SO_4 , EDTA und Natriumcitrat.

Im Hinblick auf die entgegengesetzte Wirkung von Calcium und Citrationen war es von großem Interesse festzustellen, ob Citratplasma und Serum unterschiedliche LCAT-Aktivitäten aufweisen. Es ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede (6). Harnstoff und Gallesalze haben eine hemmende Wirkung auf die LCAT-Aktivität. 6 Mol Harnstoff bewirken eine vollkommende, durch Dialyse irreversible Hemmung (11), während die durch 5×10^{-3} Mol hervorgerufene Hemmung reversibel ist (13).

In einer weiteren Reihe von Versuchen wurde der Einfluß von Substanzen mit Sulfhydryl-Gruppen und von ATP auf die LCAT-Reaktion untersucht. Die Menge der eingesetzten Substanzen blieb konstant, während die Molarität von 0,01 bis 1,0 gesteigert wurde. Alle verwendeten Substanzen, außer Thiomerosal haben eine stimulierende Wirkung. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 und 8 wiedergegeben.

Aufgrund ihrer stimulierenden Wirkung ist versucht worden, einige dieser Substanzen in den Ansatz einzubauen. Trotzdem Thiophenol den stärksten stimulierenden Effekt hat, mußte wegen des unangenehmen Geruches von seiner Verwendung abgesehen werden. Da die Dämpfe der Thioglykolsäure giftig sind, wurde jedoch das Gluthation

als Aktivator vorgezogen. Um zu sehen, wessen Stimulation bei einer kurzen Inkubation am stärksten ist, wurden Zeitkurven bei 25°C und 37°C durchgeführt. Bei diesen Versuchen wurden 0,5 molare Lösungen von Thiophenol, Thioglykolsäure und Gluthation verwendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 wiedergegeben.

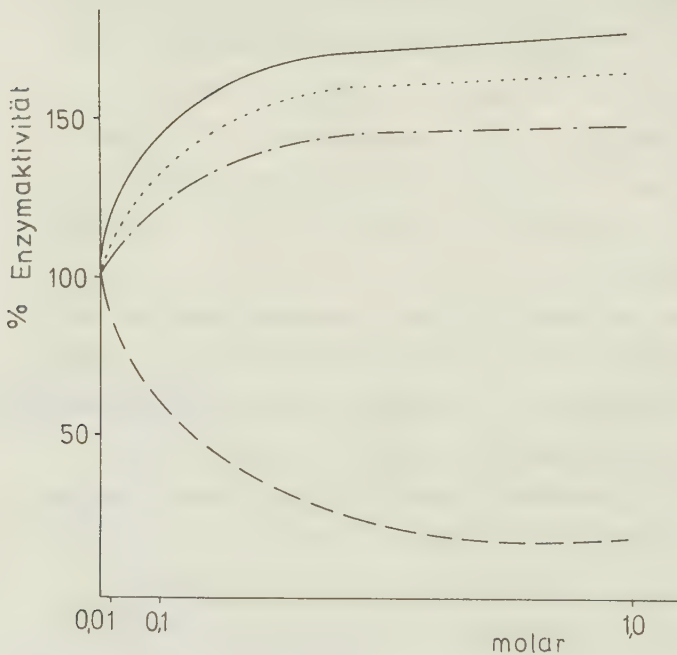


Abbildung 7

Der Effekt von Thiophenol (———), Thioglykolsäure (.....), Cystein (-.-.-) und Thiomerosal (-----) auf die LCAT-Aktivität. Inkubationszeit: 6 Stunden bei 37°C. Trennungsverfahren: Digitoninfällung.

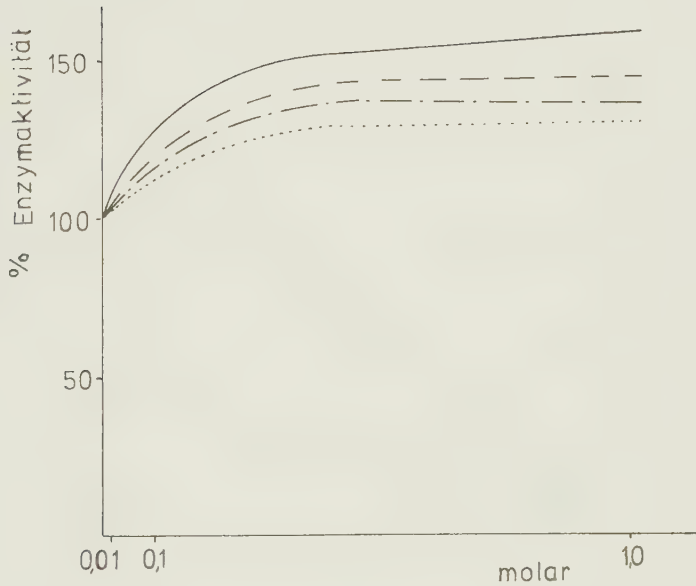


Abbildung 8

Der Effekt von Thioaethylenglykol (———), Thioaepfelsäure (-----), Gluthation (-.-.-) und ATP (.....) auf die LCAT-Aktivität. Inkubationsbedingungen wie bei Abb.7

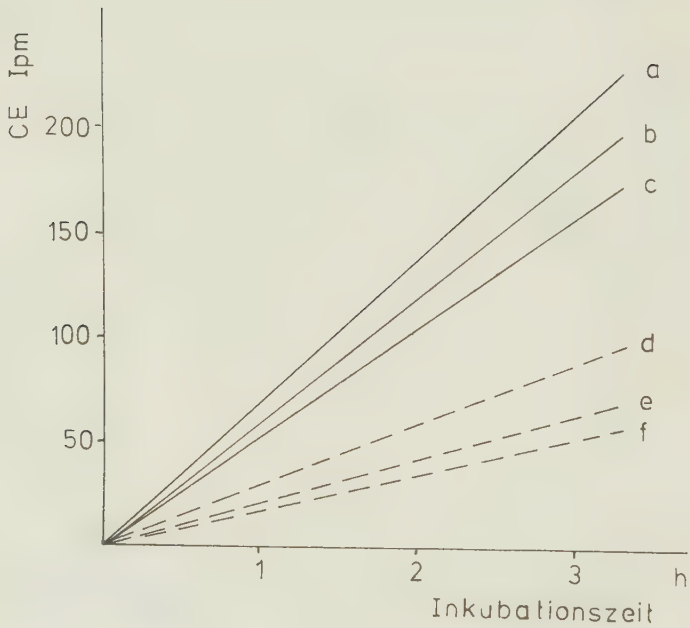


Abbildung 9

Zeitkurve bei 25°C (----) und 37°C (———) mit 0,5 molaren Lösung von Thiomerosal (a), Thioglykolsäure (b) und Gluthation (c). Trennungsv erfahren: Digitoninfällung.

6. Die Stabilität der LCAT

Die Untersuchung der Enzymstabilität wurde mit Seren durchgeführt, welche je 1,2 und 4 Tage bei Zimmertemperatur bei 4°C und -25°C aufbewahrt wurden. Die Ergebnisse sind aus Abbildung 10 ersichtlich.

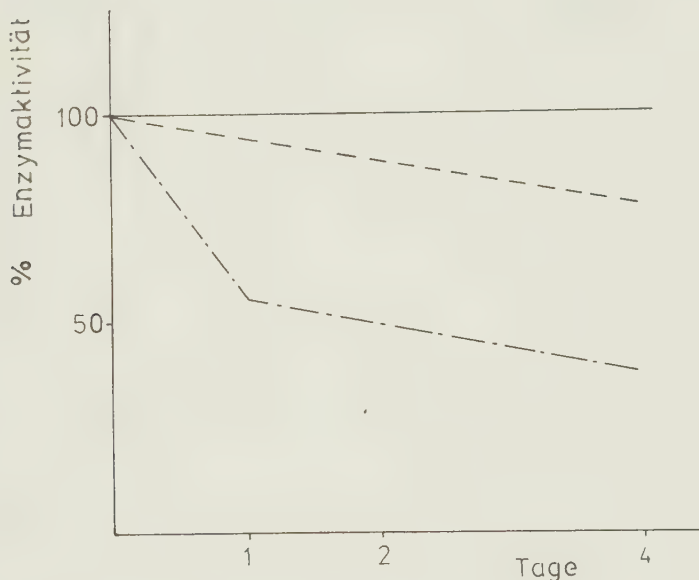


Abbildung 10

Der prozentuelle Abfall der LCAT-Aktivität bei -25°C (—), bei 4°C (---) und Zimmertemperatur (-.-.-).

Inkubationszeit: 3 Stunden bei 37°C.

Trennungsvorgang: Digitoninfällung. Die Ergebnisse sind in % der Ausgangsaktivität angegeben.

Bei -25°C ist kein meßbarer Verlust der Enzymaktivität zu verzeichnen, bei Zimmertemperatur beträgt der Abfall nach 4 Tagen 65%. Es bleibt noch zu untersuchen, ob dieser Abfall der LCAT-Aktivität auf eine Enzymalteration oder auf eine Verminderung des endogenen Cholesterins, der Fettsäuredonatoren oder der SH-Gruppen zurückzuführen ist. Letzteres wäre damit zu erklären, daß während der 4 Tage die Veresterung des endogenen Cholesterins weiterläuft und dadurch ein Verbrauch an Fettsäuren und SH-Gruppen stattfindet.

7. Normwerte

Es wurde die LCAT-Aktivität in Seren von 105 Personen untersucht; davon waren 52 Frauen und 53 Männer. Das Alter der Personen lag zwischen 20 und 70 Jahren. Sie wurden in 5 Altersgruppen eingeteilt, wovon eine im Durchschnitt 10 Frauen und 10 Männer enthielt. Die für die einzelnen Altersklassen gefundenen Werte der LCAT-Aktivität sind in Tabelle 2 und 3 zusammengefaßt und in Abbildung 11 und 12 grafisch dargestellt.

Die Einzelwerte wurden im Histogramm aufgeschlüsselt und die kumulative Häufigkeit auf Millimeterpapier und linearem Wahrscheinlichkeitspapier aufgetragen (Abbildung 13-21). Die Darstellungen ergaben übereinstimmend das Bild einer linearen Normverteilung.

Die Werte der einzelnen Altersklassen wurden untereinander und die der beiden Geschlechter gegeneinander im t-Test nach Student korreliert. Die bei der ersten Durchsicht der Werte auffallende etwas höhere LCAT-Aktivität beim männlichen Geschlecht ließ sich anhand der Ergebnisse des t-Testes statistisch nicht sichern. Die p-Werte lagen durchschnittlich $< 0,4 > 0,3$. Geschlechtsabhängige Differenzen waren damit nicht signifikant.

Im Vergleich der Altersklassen untereinander war keine Signifikanz zwischen zwei nachfolgenden Dezenien zu ermitteln. Die Unterschiede zwischen dem 2 und 5 bzw. 6 Dezenium waren dagegen hoch signifikant ($p < 0,001$). Beim Menschen besteht damit eindeutig eine Abhängigkeit

der LCAT-Aktivität vom Lebensalter. Die Enzymaktivität fällt vom frühen Lebensalter langsam und relativ gleichmäßig ab.

Bei allen Personen konnte angenommen werden, daß sie keine Leberschäden hatten. Die Bilirubinwerte lagen unter 1,0 mg%, die Transaminasen unter 12 mE/ml und die alkalische Phosphatase war kleiner als 50 IE (Bessey und Lowey eigene Modifikation).

Tabelle 2

Normwerte mit doppelter Standardabweichung
(nicht nach Geschlechtern geordnet)

Alter	N	$\bar{X}_d$	2s - Bereich
20 - 30	25	24,4	21,6 - 27,2
30 - 40	23	23,1	20,8 - 25,4
40 - 50	22	21,9	19,7 - 24,1
50 - 60	21	18,8	17,2 - 20,4
60 - 70	23	16,1	14,5 - 17,7

Tabelle 3

Normwerte mit doppelter Standardabweichung
(nach Geschlechtern geordnet)

Frauen			Männer	
Alter	N	2s - Bereich	N	2s - Bereich
20 - 30	12	19,6 - 25,0	13	23,1 - 29,1
30 - 40	12	20,3 - 24,7	11	19,3 - 25,1
40 - 50	12	19,7 - 23,5	10	19,8 - 24,7
50 - 60	11	17,4 - 21,0	10	17,0 - 19,8
60 - 70	11	15,3 - 18,7	12	13,7 - 16,7

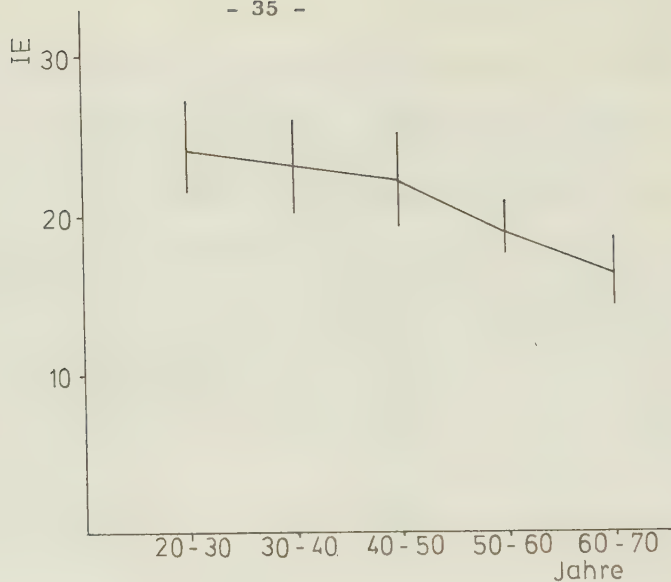


Abbildung 13

Verteilung der Normwerte, nicht nach Geschlechtern geordnet.

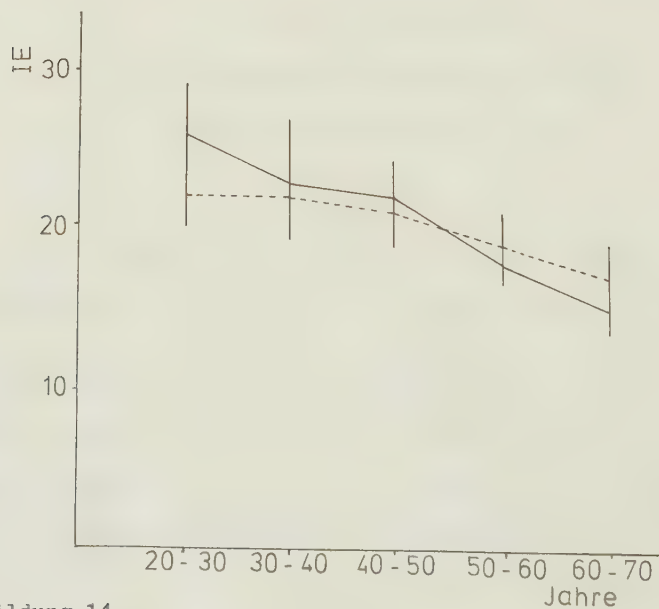


Abbildung 14

Verteilung der Normwerte, nach Geschlechtern geordnet.
weiblich (- - - - -), männlich (———).

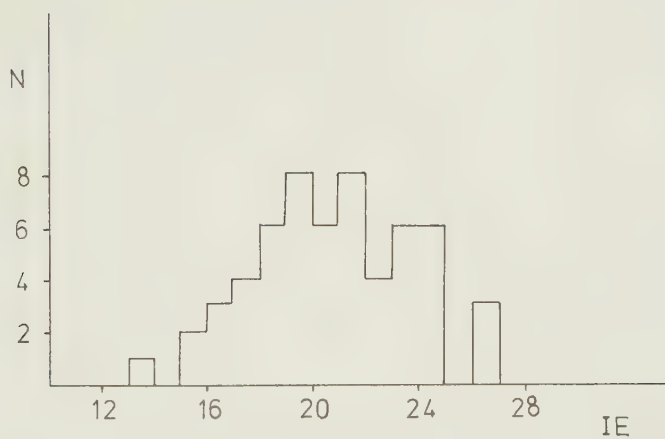


Abbildung 15

Aufschlüsselung der Einzelwerte im Histogramm (Frauen).

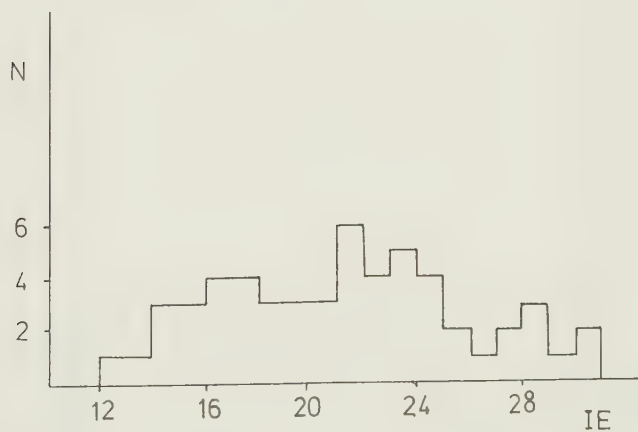


Abbildung 16

Aufschlüsselung der Einzelwerte im Histogramm (Männer).

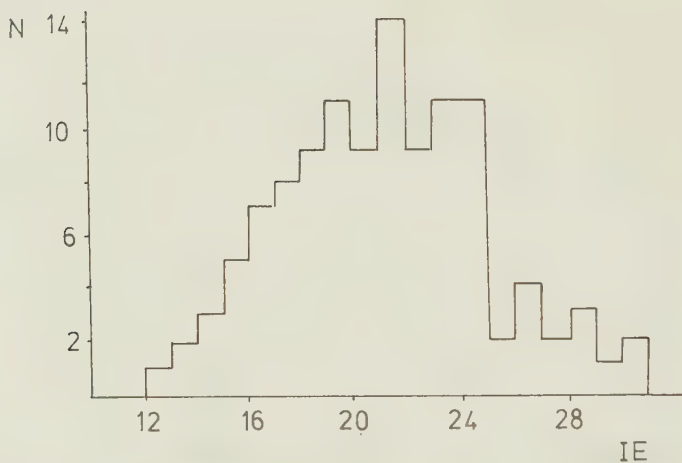


Abbildung 17

Aufschlüsselung der Einzelwerte im Histogramm (nicht nach Geschlechtern geordnet).

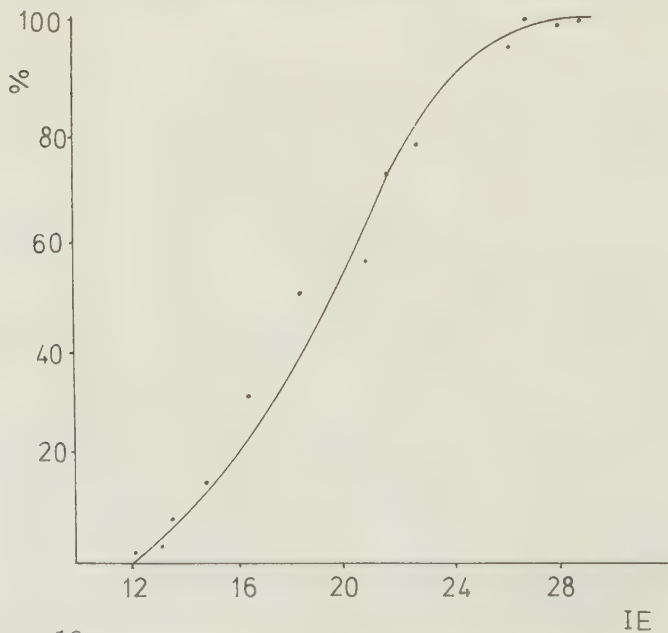


Abbildung 18

Kumulative Häufigkeit bei den weiblichen Probanden.

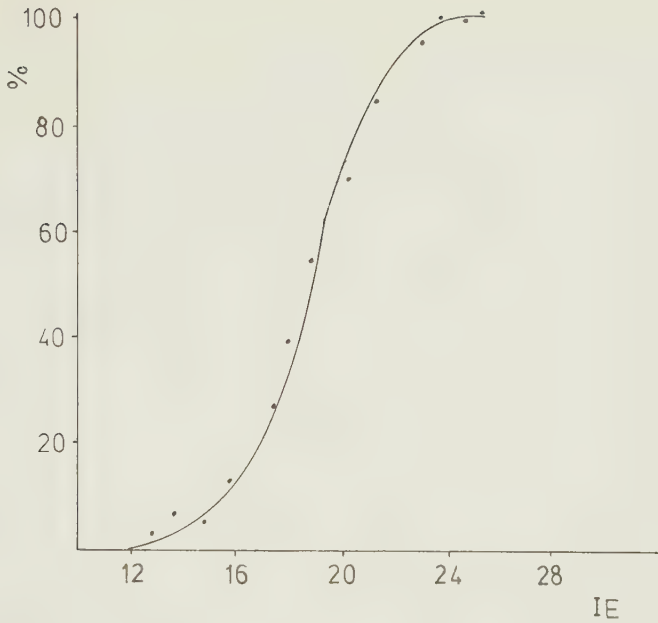


Abbildung 19

Kumulative Häufigkeit bei den männlichen Probanden.

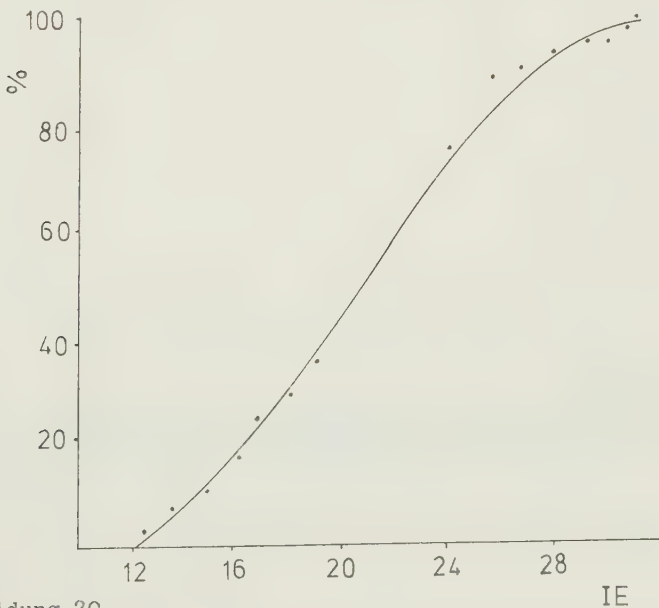


Abbildung 20

Kumulative Häufigkeit nicht nach Geschlechtern geordnet.



Abbildung 21

Kumulative Häufigkeit auf Wahrscheinlichkeitspapier
bei den weiblichen Probanden.



Abbildung 22

Kumulative Häufigkeit auf Wahrscheinlichkeitspapier
bei den männlichen Probanden.



Abbildung 23

Kumulative Häufigkeit auf Wahrscheinlichkeitspapier, nicht nach Geschlechtern geordnet.

Das von G j o n e und N o r u m (7) 1968 zum ersten Mal beschriebene Syndrom Anämie, Proteinurie, Hornhauttrübung und als laborchemischer Hauptbefund ein fast kompletter Mangel an Cholesterinestern bei normalem oder erhöhtem Cholesterinspiegel zeigte, daß die LCAT klinische Bedeutung erlangt hat. Bei dem oben genannten Krankheitsbild, von dem bis jetzt 7 Fälle beschrieben wurden, handelt es sich um einen Mangel an LCAT-Aktivität im Blut. Damit erhebt sich die Frage nach einer praktischen Methode zur Reihenbestimmung der LCAT-Aktivität. Die in der vorliegenden Untersuchung angewandte Technik besteht aus 3 Arbeitsschritten:

1. Inkubation des Serums mit ^{14}C -Cholesterin als Substrat über eine Dauer von 6 Stunden bei 37°C ,
2. Abtrennung der Cholesterinester durch Dünnschichtchromatografie bzw. Digitoninfällung,
3. Messung der in die Cholesterinesterfraktion eingebauten ^{14}C -Menge.

Eine Untersuchungsreihe kann praktisch an einem Tag durchgeführt werden. Von Nachteil ist die Verwendung von ^{14}C -markiertem Cholesterin, das den Test verteuert und die Durchführung in einem radiochemischen Laboratorium notwendig macht.

Vom biochemischen Standpunkte aus hat die Methode den Nachteil, daß kein konstantes Angebot an Fettsäuredonatoren eingesetzt wird. Dadurch läßt es sich nicht feststellen, ob Veränderungen der LCAT-Aktivität auf das wechselnde Angebot an Lipoproteidsubstrat zurückzuführen

sind, was bei der Bewertung der Ergebnisse in pathologischen Fällen von großer Bedeutung wäre.

Die Altersabhängigkeit der LCAT-Aktivität ist schon von vielen Autoren beobachtet worden. W a g n e r und P o i n d e x t e r (17) berichten, daß die Veresterungsgeschwindigkeit bei 17-20 jährigen Frauen höher war als bei Frauen mittleren Alters. G h e r o n d a c h e (18) beschrieb auch eine höhere LCAT-Aktivität bei 20-39-jährigen als bei 40-99 Jahre alten Personen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die Altersabhängigkeit der LCAT-Aktivität. Die Ursache des altersbedingten Abfalls ist wahrscheinlich in mehreren Faktoren zu suchen, deren Einfluß auf die LCAT-Aktivität noch keinesfalls geklärt ist. Einzelne von ihnen sind bereits zum Teil an Versuchstieren untersucht:

1. Mit dem zunehmenden Alter treten Veränderungen sowohl in der Struktur als auch in der Konzentration der Lipoproteide auf. Ein Abfall der Lipoproteide hoher Dichte würde auch eine verminderte Cholesterinveresterung bewirken, da die eine entscheidende Rolle in der Anfangsphase der Reaktion spielen.
2. Über den Einfluß des Cholesterinspiegels auf die Veresterung gehen die Meinungen auseinander. G h e r o n d a c h e stellte bei Frauen mit einem hohen Blut-Cholesterinspiegel eine geringe Veresterungsrate fest. Andererseits behaupten M o n g e r und N e s t e l (19) eine direkte Beziehung zwischen dem Veresterungsgrad und Cholesterinspiegel festgestellt zu haben. Personen mit hohem Cholesterinspiegel zeigten bei

diesen Autoren eine erhöhte Veresterungsrate. Die Zusammensetzung und Struktur der Lipoproteide wurden leider nicht mehr untersucht, da sie über die Ursache des Veresterungsanstieges evtl. Aufschluß hätten geben können. Besonders interessant sind in diesem Zusammenhang die Ergebnisse von S h a p i r o (39), welcher bei Kaninchen, Hühner und Ratten diätetisch eine Hypercholesterinämie erzeugte und dann die Cholesterinveresterungsrate untersuchte. Bei Kaninchen, deren Cholesterinspiegel auf das Vierzigfache gestiegen war, konnte gar keine Veresterung mehr beobachtet werden. Die LCAT-Aktivität im Hühnerserum mit einem drei- bis viermal so hohem Cholesterinspiegel, wie man normalerweise findet, ist um das Siebenfache gesunken, während sie im Rattenserum der weiblichen Tiere um das 1,3-fache und bei den männlichen Tieren um das 2,4-fache gesunken ist. Der Cholesterinspiegel betrug das 3-4-fache des Normalwertes. Im Humanserum wurden ähnliche Beobachtungen gemacht: Bei einem Gesamtcholesterin von 300 mg/ 100 ml beträgt die Veresterung 29 mg/ 100 ml / 24 Stunden, aber bei einem Anstieg auf 350 mg/ 100 ml fällt die Veresterung auf 18 mg/ 100 ml / 24 Stunden. In vitro konnte diese Abnahme der Cholesterinveresterung bei steigender Cholesterinkonzentration nicht beobachtet werden, was zu der Annahme führen könnte, der Cholesterinanstieg sei von einer verminderten LCAT-Aktivität verursacht. Die Situation im Hormonhaushalt darf ebenfalls nicht vernachlässigt werden. S e m e n ú k und B e h e r (40)

untersuchten die Cholesterinveresterung bei hypophysectomierten und thyroidektomierten Ratten und Hamstern und stellten dabei fest, daß diese Eingriffe einen geringen Einfluß auf die Veresterungsgeschwindigkeit haben, aber Veränderungen in der Struktur der Cholesterinester verursachen. Dabei wird entweder die Fettsäurespezifität der LCAT oder die Zusammensetzung der β -ständig gebundenen Lecithinfettsäuren verändert. Auch die Geschlechtsabhängigkeit der LCAT-Aktivität kann in diesem Zusammenhang gesehen werden. A f t e r g o o d und A l f i n-S l a t e r stellten bei den weiblichen Ratten eine höhere Veresterungsrate fest als bei den männlichen, während die LCAT-Aktivität im Serum legender Hennen geringer ist als bei Hähnen. Diese Differenz kann mit großer Wahrscheinlichkeit den hormonellen Unterschieden zwischen den beiden Geschlechtern zugeschrieben werden, denn nichtlegende Hennen und Hähne weisen die gleiche Veresterungsaktivität auf. Auch die Leber scheint hier eine wesentliche Rolle zu spielen, denn die Bildung von Lipoproteiden und ihre Freigabe in die Blutbahn ist bei legenden Hennen bedeutend beschleunigt (22,24). Die letztere Feststellung könnte auch zur Klärung der verminderten LCAT-Aktivität bei Lebererkrankungen beitragen.

Ob beim Menschen eine Geschlechtsabhängigkeit der Serum-LCAT-Aktivität vorhanden ist, muß aufgrund der vorgelegten Ergebnisse verneint werden, da die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant waren.

V. ZUSAMMENFASSUNG

1. Der Vorgang der intravasalen Cholesterinveresterung ist eine Lecithin:Cholesterin-Acyltransferase-Reaktion, welche von der Lecithin:Cholesterin-Acyltransferase (LCAT, EC 2.3.1.) katalysiert wird. Als Endprodukte entstehen Lysolecithin und Cholesterinester.
2. Die angewandte Untersuchungstechnik besteht in der Inkubation des Serums mit ^{14}C -Cholesterin als Substrat und die Messung der in die Cholesterinesterfraktion eingebaute ^{14}C -Menge.
3. Eine maximale Cholesterinveresterung wurde mit dem Tris/HCl-Puffer (pH 7,5-02 molar) bei einer Inkubationszeit von 6 Stunden bei 37°C erzielt.
4. MnCl_2 , MgCl_2 , CaCl_2 sowie Harnstoff und Gallesalze haben auf die LCAT-Reaktion eine hemmende Wirkung.
5. Die eingesetzten Substanzen mit Sulfhydryl-Gruppen bewirken mit Ausnahme von Thiomerosal eine Stimulation.
6. Bei einer Aufbewahrungstemperatur von -25°C ist die LCAT stabil, wobei bei 4°C ein Verlust von 22% und bei Zimmertemperatur von 65% festgestellt wurde.
7. Die LCAT-Aktivität wurde in Serum von 105 gesunden Personen (52 Frauen und 53 Männer), deren Alter zwischen 20 und 70 Jahren lag, untersucht. Die Normverteilung ist linear. Die altersabhängigen Unterschiede zwischen dem 2 und 5 bzw. 6 Dezenium sind hoch signifikant, während die geschlechtsabhängigen Unterschiede nicht signifikant sind.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. Sperry, W.M., J. Biol. Chem. 111, 467 (1935)
2. Glomset, J.A., F.Parker, M.Tjaden und R.H.Williams, Biochim.
Biophys. Acta, 58, 398 (1962)
3. Le Breton, E., und J.Pantaleon, Compt.Rend.Soc.Biol.,138,38(194
4. Etienne, J. und J.Polonovski, Bull.Soc.Chim.Biol.41,321 (1959)
5. Glomset, J.A., Biochim. Biophys. Acta, 65, 138 (1962)
6. Glomset, J.A., J.Lipid Res., 9, 155 (1968)
7. Gjone, E. und K.R.Norum, Nord. Med. 80, 878 (1968)
8. Vahouny, G.V. und Treadwell, C.R.,Methods Biochem.Anal,116,219
9. Portman,O.W.und Havel,R.J., J.Lipid Res., 2, 357 (1961)
10. Goodman, D.S., J. Clin. Invest., 43, 2026 (1964)
11. Glomset,J.A.und J.L.Wright, Biochim.Biophys.Acta,89,266 (1964)
12. Ratti,A.und P.Bianchi,Soc.Lombarda Sci.Med.Biol.12,163 (1957)
13. Sperry,W.M., und Stoyanoff,V.A., J.Biol.Chem,121,101 (1937)
14. Portman, O.W.und Sugano,M.,Arch.Biochem.Biophys.,105,532 (1964)
15. Goodman,D.S., J.Clin.Invest., 43, 2026 (1964)
16. Sugano, M., J.Biochem., Vol.60, 2 (1964)
17. Wagner, A.und M.Poindexter, J.Lab.Clin.Chem., 40, 321 (1952)
18. Gherondache, C.N., J.Clin. Endocrinol.Metab., 23, 1024 (1963)
19. Monger, E.A. und P.J.Nestel, Clin.Chem.Acta,15, 269 (1967)
20. Glomset, J.A., R.Kennedy und J.Dobbins, E.Jansen, J.Lipid Res.,
7, 638 (1966)
21. Portman, O.W. und M.Sugano, Arch.Biochem.Biophys.,109,302(1965)
22. Sugano, M., J.Biochem., Vol.61, 3 (1967)
23. Brot, N.,W.J.Lossow, I.L.Chaikoff, J.Lipid Res.,3,413 (1962)
24. Vastone,W.E.und Maw,W.A.,Can.J.Biochem.Biophys.,33,831 (1955)
25. Glomset, J.A. und D.N.Kaplan,Biochem.Biophys.Acta,98,41 (1965)

26. Friedman, M. und S.O.Byers, J.Clin.Invest.34, 1369 (1955)
27. Goodman, D.S., D.Deykin und T.Shiratori, J.Biol.Che.,239,
1335, (1964)
28. Swell, L.und M.D.Law, Arch.Biochem.Biophys.,113, 143 (1966)
29. Gidez, L.I., P.S.Roheim und H.A.Eder, J.Lipid Res., 8, 7 (1967)
30. Dietschy, J.M.und M.D.Siperstein, J.Lipid Res., 8,97 (1967)
31. Murphy, J.R., J.Lab.Clin.Med., 60, 86 (1962)
32. Courtice, F.C.und B.Morris, Quart.J.Exptl.Physiol.,40,138(1955)
33. Castro Mendoza,H.und C.Jimenez Diaz,Bull.Inst.Med.Res.,2,81(1949)
34. Turner, K.B., G.H. McCormack und A.Richards, J.Clin.Invest.,
32, 801 (1953)
35. Phillips, G.B., J.Clin.Invest., 39, 1639 (1960)
36. Glomset, J.A., Biochim.Biophys.Acta, 70, 389 (1963)
37. Spalm, U. und U.Eltz, Z.Kinderheilk. 105, 226 (1969)
38. Caren,R. und L.Corbo, J.Clin.Endocrinol.Metab.,26,470 (1966)
39. Shapiro,I.L., Jamstremsky,J.A. und Kritchewsky, D., Lipids Vol.3
Nr.4, 381 (1968)
40. Semenuk, G.und W.T.Beher, Life Sciences, Vol.8, 183, (1969)
41. Norum, K.R.Borsting S. und Grundt, I.,Acta med.scand.188 (1970)
42. Hamnström,B.Gjone,E., Norum,K.R., Britisch,Med.Journal 2 (1969)

Diese Arbeit wurde im Isotopenlabor der
Medizinischen Poliklinik der Universität
München ausgeführt.

Herrn Prof. Dr.med.D.Eberhagen danke ich
für die Überlassung des Themas, sowie
für seine freundlich gewährte Hilfe bei
der Ausführung und Korrektur dieser
Arbeit.

Meinen Dank möchte ich auch allen ande-
ren aussprechen, insbesondere Frau Dr.med.
J.Rux, die mich bei der Durchführung der
Arbeit unterstützt hat.

LEBENS LAUF

Name: T e u t s c h, Eberhard, Gustav

Geburtsdatum-und ort: 27.Februar 1945 in Mediasch
(Siebenbürgen), Rumänien

Vater: Dr.med.Georg Teutsch,
Facharzt für Geburtshilfe und Gynäkologie

Mutter: Else geb. Reissenberger,
Hausfrau

Religion: Evang.-luth.

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung und
beruflicher Werdegang:

Sept.1952-Juni 1959	Volksschule in Reps (Rumänien)
Sept.1959-Juni 1963	Mittelschule mit Abiturabschluß in Kronstadt (Rumänien)
Okt.1963-Juli 1965	Fachschule für medizin-technische Assistenten für klinisches Labor in Kronstadt (Rumänien)
Okt.1965-Dez.1967	5 Fachsemester für Humanmedizin an der Universität Jassy (Rumänien)
28.Dezember 1967	Legale Ausreise aus Rumänien im Rahmen der Familienzusammenführung in die Bundesrepublik Deutschland
April 1968-Febr.1971	7 Fachsemester für Humanmedizin an der Universität München
Dezember 1971	Staatsexamen an der Universität München
Jan.1972-Jan.1973	Medizinalassistent an der Privatklinik Dr.med.M.Boruth, München und am KKH München-Perlach
Mai 1973-Sept.1973	Assistenzarzt für Chirurgie am KKH München-Perlach
September 1973	Finberufung zur Bundeswehr
Seit Oktober 1973	Tätig am Bundeswehrkrankenhaus München, Abteilung Anästhesie.

